

STRAHLENEMPFFINDLICHKEIT DER INDUKTION
VON FRÜHEN ENZYMEN BEI γ -BESTRAHLTEN

T 7 - PHAGEN

ELFRIEDE BOPP

—

1975
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Direktor: Prof. Dr. K.G. Zimmer

Strahlenempfindlichkeit der Induktion von frühen

Enzymen bei γ -bestrahlten T7-Phagen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

in der gesamten Medizin

vorgelegt

von

Elfriede Bopp

aus

Tübingen

1975



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Hug

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 1975

Diese Arbeit wurde im Institut für Strahlenbiologie im Kernforschungszentrum Karlsruhe unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. U. Hagen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K.G. Zimmer gilt mein Dank für sein freundliches Entgegenkommen und die großzügige Arbeitsmöglichkeit am Institut. Besonderen Dank schulde ich Prof. Dr. Dr. U. Hagen für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und viele wertvolle Anregungen und Ratschläge. Auch Mme Dr. Th. Coquerelle möchte ich herzlich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit danken. Fräulein Bischoff und Frau Baum danke ich für die Bereitstellung der Phagenlysate.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Phagen und Bakterien	4
2.2. Medien und Biochemikalien	4
2.3. Herstellung einer Phagensuspension	6
2.4. Reinigung im CsCl-Gradienten	6
2.5. Titration von Phagen	7
2.6. T7-DNS-Isolierung	7
2.7. Herstellung der Zellextrakte	7
2.8. Bestimmung der Lysozymaktivität im Zellextrakt	8
2.8.1. Herstellung sensibilisierter Zellen	8
2.8.2. Lysozymtest	8
2.9. Bestimmung der RNS-Polymeraseaktivität im Zellextrakt	9
2.10. Bestrahlung	9
3. Experimente und Ergebnisse	10
3.1. Beschallungsdauer der Bakterienzellextrakte	10
3.2. Bedingungen für die Bestimmung der Enzymaktivitäten	10
3.2.1. Lysozymaktivität	10
3.2.2. RNS-Polymeraseaktivität	11
3.3. Zeitkinetik der Induktion von Enzymaktivitäten nach Phageninfektion	11
3.3.1. Zeitkinetik des Lysozyms	11
3.3.2. Zeitkinetik der RNS-Polymerase	11
3.4. Bestrahlungsbedingungen für die T7-Phagen	12
3.5. Inaktivierungskurve der Enzyminduktion	12
4. Diskussion	13
4.1. Vergleich der einzelnen Strahlenreaktionen im Bakteriophagen	13

	Seite
4.2. Modelle der Hemmung der Injektion des Phagengenoms	14
4.3. Mögliche Fehler der Versuchsergebnisse	15
4.4. Modell der Injektionshemmung nach der Region der frühen Enzyme	16
4.5. Strahlenempfindlichkeit der Lysozyminduktion	17
5. Zusammenfassung	18
6. Literaturverzeichnis	19
7. Abbildungen	23

1. Einleitung

Die Einwirkung ionisierender Strahlung, z.B. Röntgen- oder γ -Strahlung, auf biologische Objekte hat eine Vielfalt von chemischen und biologischen Veränderungen zur Folge. Diese lassen sich in zeitlichen Phasen auftrennen (Abb. 1). In der ersten, der physikalischen Phase, entstehen durch Energieübertragung an die Materie elektronisch angeregte oder ionisierte Moleküle, die sehr instabil sind und in der physiko-chemischen Phase weiterreagieren, wobei freie Atome und Radikale entstehen. Diese aktivierten Moleküle treten in der chemischen Phase untereinander oder mit ihrer Umgebung in Reaktion. Im ersten Fall findet die Energieabsorption und die chemische Veränderung im gleichen Molekül statt, was als "direkter Effekt" bezeichnet wird. Im zweiten Fall tritt zumeist eine Wechselwirkung des biologischen Makromoleküls mit den aus Wasser entstandenen Radikalen $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$ und solvatisierten Elektronen der Umgebung auf; man spricht von "indirektem Effekt". Bei Bestrahlung in vivo hat man es gleichzeitig mit beiden Effekten zu tun. Im Verlauf der biologischen Phase manifestiert sich schließlich der Strahlenschaden in Veränderung der Struktur und Funktion der Zelle, in einer Mutation oder führt zum Zelltod.

Die biologische Inaktivierung von Organismen kann im wesentlichen auf eine Schädigung der Erbinformation, der Desoxyribonukleinsäure (DNS), zurückgeführt werden (vgl. Dertinger und Jung, 1969, Latarjet, 1972). Die Zusammenhänge zwischen der Schädigung der physikalisch-chemischen Struktur und der Inaktivierung der biologischen Funktion sind hier im einzelnen zu untersuchen. Ionisierende Strahlung verursacht an der DNS Brüche der Nukleotidkette, wobei an dem doppelsträngigen Molekül entweder nur ein Strang (Einzelstrangbruch) oder beide (Doppelstrangbruch) gebrochen sein können. Ferner können die Nukleotidbasen zerstört sein - man spricht von Basenschäden - oder die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Basenpaaren geöffnet werden (Weiss, 1964, Ullrich und Hagen, 1968). Die Häufigkeit der einzelnen Strahlenschäden hängt dabei im wesentlichen von den Bestrahlungsbedingungen ab, ob in Lösung, im Trockenen oder in vivo bestrahlt wird.

Für solche Untersuchungen an der bestrahlten DNS erwiesen sich sehr einfache biologische Einheiten, wie etwa Bakteriophagen, als besonders geeignet. Bei der Inaktivierung von Bakteriophagen hat man vor allem die Zusammenhänge zwischen der Zahl der strahlenbedingten Strangbrüche und der biologischen Inaktivierung untersucht (Bohne, Coquerelle, Hagen, 1970, Freifelder, 1965, 1966, Ginoza, 1967). Hier bietet sich der Vorteil, daß die DNS im intakten Bakteriophagen, also gewissermaßen in vivo, bestrahlt werden kann und daß die umgebenden Hüllproteine sehr schonend ohne Schädigung der DNS entfernt werden können. Bei diesen Untersuchungen wurde gefunden, daß bei einem Viertel bis einem Drittel der inaktivierten Phagen Doppelstrangbrüche entstanden sind, während die übrigen Phagen durch andere Ereignisse inaktiviert werden. Weiter ließ sich zeigen, daß pro inaktivierendem Ereignis 3 Einzelstrangbrüche auftreten; ein Einzelstrangbruch pro Genom wirkt somit noch nicht letal. Möglicherweise wird ein Teil der Einzelstrangbrüche nach der Infektion des Phagen in der Wirtszelle wieder repariert.

Neben den physikochemischen Veränderungen an der DNS interessierte auch die Wirkung ionisierender Strahlung auf die einzelnen Vermehrungsschritte des Bakteriophagen (Watson, 1950/52, Lytle und Ginoza, 1969, Coquerelle und Hagen, 1972, Schön, 1973). Dabei wurde gefunden, daß strahleninaktivierte Phagen noch zu 95 % an die Zellwand zu adsorbieren vermögen, daß aber nur 70 % von ihnen in der Lage sind, ihr Genom in die Wirtszelle zu injizieren. Ob bei der Hemmung der Injektion durch γ -Bestrahlung bestimmte physikochemische Strukturschäden die Ursache sind, oder ob diese Hemmung unabhängig davon eintritt, wurde von verschiedenen Autoren diskutiert. Einzelstrangbrüche haben keinen Einfluß auf die Injektion. Für die Wirkung der Doppelstrangbrüche auf die Injektion wurden zwei Modelle erwogen:

1. Die DNS-Moleküle mit Doppelstrangbrüchen beginnen mit der Injektion, jedoch nur bis zur ersten Läsionsstelle. Diese Möglichkeit, die im folgenden als "Modell der teilweisen Injektion" bezeichnet wird, wurde von Harm (1958) für T4 und von Sharp und Freifelder (1971) für den Bakteriophagen λ beschrieben.

2. Die Phagen mit Doppelstrangbrüchen haben die Fähigkeit, ihre DNS zu injizieren, vollständig verloren, während die Phagen ohne Doppelstrangbrüche ihre ganze DNS injizieren. Dieses "Alles- oder Nichts-Modell" wurde von Coquerelle und Hagen (1972) für T1 wahrscheinlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit dem Mechanismus der Injektion des Genoms bestrahlter Phagen. Die Injektion beginnt immer an dem einen Ende des Phagen-DNS-Moleküls, wobei zuerst solche Gene in das Wirtsbakterium gelangen, die die Synthese phagenspezifischer Enzyme auslösen, die der sogenannten "frühen Enzyme". Die "späten Enzyme" - ihre Gene liegen in der Mitte oder am Ende der Phagen-DNS - werden erst zu späterer Zeit nach der Infektion im Wirtsbakterium abgelesen und synthetisiert. Die Transkription zur m-RNS besorgt dabei die phagenspezifische RNS-Polymerase, die als frühes Enzym unmittelbar nach der Injektion vom Wirt transkribiert und synthetisiert wird. Diese Zusammenhänge wurden vor allem von Hausmann und Härtle (1971) sowie von Herrlich und Schweiger (1971) an T7- und T3-Phagen erarbeitet.

Die Induktion phagenspezifischer Gene bietet somit die Möglichkeit, Einblicke in die Hemmung der Injektion nach Bestrahlung zu gewinnen. Strahlenbiologische Erfahrungen über Bruchentstehung, Adsorption und Injektion in bestrahlten Phagen lagen vor allem für T1-Phagen vor. Da jedoch bei diesen Phagen eine Bestimmung phagenspezifischer Gene nicht möglich war (siehe Ergebnisse), wurde für die folgenden Untersuchungen der Bakteriophage T7 gewählt. Er gehört mit T3 zu den kleinsten T-Phagen. Das doppelsträngige lineare DNS-Molekül hat eine Länge von 12 μ , sein Molekulargewicht wird in der Literatur mit $25 \pm 2 \times 10^6$ Dalton angegeben (Rubinstein, 1968). Man hat 19 Gene gefunden, diese codieren etwa 30 Proteine (Studier, Maizel, 1969).

Unmittelbar nach der Adsorption an eine Wirtszelle injiziert T7 sein Genom. Am "Heavy"-Strang erfolgt die Transkription des Genoms vor 3' in 5'-Richtung. Gen 1 wird durch die RNS-Polymerase des Wirtes transkribiert. Es codiert für die "frühen" Enzyme, zu denen die Phagen-RNS-Polymerase gehört. Der Rest des Phagengenoms wird von der Phagen-RNS-Polymerase transkribiert. Als "frühes Enzym"

untersuchten wir deshalb die phagenspezifische RNS-Polymerase und als Enzym, das erst später abgelesen wird, das Lysozym.

2. Material und Methoden

2.1. Phagen und Bakterien

In allen Versuchen wurde mit dem Bakteriophagen T7 und mit Escherichia coli B gearbeitet, die aus dem Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft von Dr. R. Knippers stammen. Für die Herstellung sensibilisierter Zellen wurden E.coli B-Zellen tiefgefroren aus dem Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg, bezogen.

2.2. Medien und Biochemikalien

Nährbouillon (0,8 % NB)

8,0 g Bacto Nutrient Broth (Difco, USA); 5,0 g NaCl ad 1 l aqua bidest; pH auf 7,0 einstellen

Trypton-Brühe (TB)

10 g Pepton, 5 g NaCl, 1 ml 1 m $MgSO_4$, ad 1 l aqua bidest; pH = 7,0.

Medium 9 (M9)

40 ml Lösung A.

(7,5 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$, 3 g KH_2PO_4 , ad 40 ml aqua bidest)

10 ml Lösung B.

(1,00 g NH_4Cl ; 0,50 g NaCl; 0,20 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, ad 10 ml aqua bidest)

10 ml 0,01 m $CaCl_2$

10 ml 5 % Casamino-Hydrolysat ad 1 l bidest

Histidinlösung

0,1 m Histidin

0,165 m NaCl

pH auf 7,0 einstellen

Indikator-Nährboden

10 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Bacto-Yeast-Extrakt, 0,5 g NaCl, 15 g Bacto Agar, ad 1 l aqua bidest. Diesem Medium werden nach Neutralisierung und Autoklavieren 40 ml 40 %ige Glukose, 32 ml 0,1 %iges Alazarin-Gelb und 7 ml 1 %iges Wasserblau zugegeben. Das Ausgießen erfolgt in sterile Petrischalen ($\emptyset$ 10 cm).

Tris

1 m Tris-Puffer, mit HCl auf pH 8,0 einstellen

Phagenpuffer (PP) nach Hershey

7,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 1,5 g KH_2PO_4 ; 4 g NaCl, 5 g K_2SO_4
ad 1 l aqua bidest, Autoklavieren

Vor Gebrauch aus sterilen Lösungen 10 ml 0,1 m $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 10 ml 0,01 m CaCl_2 zusetzen.

KCN-Chloramphenicol-Lösung

0,3 m KCN; pH 7 einstellen; 2,5 mg/ml Chloramphenicol (Leucomycin)

Scintillationsflüssigkeit

4 g PPO (2,5 Diphenyloxazol), 0,1 g Popop (1,4-bis-2(-5-Phenyl-oxazol)-Benzol), C.W. Zinsser, Frankfurt), ad 1 l Toluol.

Biochemikalien

Cytidin 5'triphosphat (CTP, kristallines Natriumsalz)
Guanosin 5'triphosphat (GTP, kristallines Litiumsalz) und
Uridin 5'triphosphat (UTP, kristallines Natriumsalz)
lieferte das Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg, ^{14}C ATP
(Natriumsalz in 50 % wässrigem Äthanol) wurde von The Radio-chemical Centre, Amersham, bezogen. Serum-Albumin vom Rind wurde von den Behring-Werken AG., Marburg-Lahn, in einem elektrophoretischen Reinheitsgrad von 100 % bezogen. DNS aus Heringsperma lieferte das Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg. Die Dialysesläuche (Porengröße ca. 24 Å) wurden von Union-Carbide, Chicago, bezogen. Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, geliefert.

2.3. Herstellung einer Phagensuspension

4 l NB (0,8 %) werden mit 50 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur von E.coli B beimpft. Diese läßt man unter Belüftung bei 37 °C bis zu einer Zellzahl von 2 bis $3 \cdot 10^8$ Bakterien pro ml wachsen. Die Zellkonzentration ermittelt man photometrisch. Eine Eichkurve ergibt die Beziehung zwischen der bei 550 nm Wellenlänge gemessenen Extinktion und der Zahl der in einer Zählkammer nach Neubauer gezählten Bakterien. In dieser exponentiellen Wachstumsphase wird die Kultur infiziert. Die mittlere Anzahl der Phagen pro Bakterium, die "Multiplicity of Infection" (m.o.i), soll 0,5 betragen. Etwa 2,5 Stunden nach der Infektion wird die Kultur klar, die Bakterien sind lysiert. Es werden 10 ml Chloroform und 200 g NaCl zugegeben. Der Titer eines Lysats sollte etwa 10^{10} Phagen pro ml betragen.

Anschließend wird das Lysat konzentriert und gereinigt. Es wird mit 1800 g Ammoniumsulfat versetzt; nach 12 h wird das Präzipitat 30 min bei 6 000 Upm in der Servall zentrifugiert. Das Sediment wird in ca. 100 ml Phagenpuffer resuspendiert. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 5 000 Upm setzen sich Verunreinigungen als Sediment ab. Der Überstand wird anschließend hochtourig 2 h bei 15 000 Upm in der präparativen Ultrazentrifuge (Spinco) zentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml Phagenpuffer resuspendiert und im CsCl-Gradienten gereinigt.

2.4. Reinigung im CsCl-Gradienten

6,7 g CsCl werden bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml mit Phagensuspension aufgefüllt. Diese wird in der Spinco 20 h bei 35 000 Upm zentrifugiert. Danach ist ein schmales, opaleszierendes Phagenband zu sehen, das in einer Tropfvorrichtung durch fraktioniertes Aus-tropfen von Verunreinigungen getrennt wird. Um das CsCl zu entfernen, muß 3 x 12 h gegen das hundertfache Volumen Phagenpuffer dialysiert werden. Der Titer des gereinigten T7-Konzentrates beträgt ca. $1 \cdot 10^{13}$ Phagen pro ml.

2.5. Titration von Phagen

Zur Bestimmung der Anzahl der Phagen wird der Plaquetest gewählt. Die Phagensuspension wird in TB in Schritten von 1:10 verdünnt. 0,1 ml der letzten Verdünnung wird mit 0,15 ml einer frischen E.coli B-Kultur auf der Indikatorplatte gleichmäßig verteilt und etwa 15 h bei 37 °C inkubiert. Es werden nun die Phagenkolonien, die um ein Phagenpartikel auf dem Bakterienrasen entstanden sind, die Plaques, gezählt. Um das Zusammenfallen von Plaques zu vermeiden, werden die Verdünnungen so gewählt, daß auf einer Platte etwa 200 - 300 Plaques zu erwarten sind.

2.6. T7-DNS-Isolierung

Das gereinigte T7-Konzentrat wird in 0,2 M NaCl, pH 7, auf ca. $5 \cdot 10^{12}$ Phagen pro ml verdünnt. Zu 1 ml Phagensuspension wird 1,5 ml 5 %iges Duponol (Endkonzentration 2 %) und ca. 4 ml H₂O gesättigtes Phenol gegeben. Es wird eine halbe Stunde vorsichtig bei 0 °C geschüttelt und anschließend bei 3 000 Upm kurz zentrifugiert, wobei das Phenol mit den gelösten Proteinen die untere Phase bildet und mit einer langen Spritzenkanüle herausgezogen werden kann. Dieser Reinigungsvorgang mit Phenol wird dreimal wiederholt. Um das in der wässrigen Phase gelöste Phenol zu entfernen, wird anschließend nach der gleichen Methode mit Äther gewaschen - die Ätherphase befindet sich oben - und zwar solange, bis die wässrige Phase mit der DNS klar ist. Anschließend wird 12 h gegen 5 l 0,01 M NaCl, pH 7, dialysiert. Die Konzentration der entnalteten DNS-Lösung läßt sich photometrisch ermitteln, wobei $E_{260}^{1\text{cm}} = 1$ einer Konzentration von 47,0 µg DNS pro ml entspricht.

2.7. Herstellung der Zellextrakte

Das Medium 9 beimpft man mit einer Übernachtskultur und läßt die Bakterienzellen unter steter Belüftung bis zu einem Titer von $5 \cdot 10^8$ pro ml wachsen. Anschließend infiziert man mit gereinigtem T7-Konzentrat mit einer m.o.i. von 10. Nach bestimmten Zeiten - der Zeitpunkt ist jedoch in jedem Falle vor der Lysis der Bakterien - wird die Reaktion mit 7 g Eis und 1 ml KCN-Chloramphenicol-Lösung pro 10 ml Zellsuspension abgestoppt. Die infizierten Bakte-

rien, die sich durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 10 000 Upm als Sediment absetzen, werden in 3 ml 0,02 m Tris, pH 7,6, aufgenommen. Durch Ultraschall werden die Zellwände zertrümmert, wobei sich eine Beschallungsdauer von 3 Minuten als ausreichend erwiesen hat. Anschließend wird der Zellextrakt bei 10 000 Upm eine halbe Stunde in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität muß der Zellextrakt noch am selben Tag verwendet werden.

2.8. Bestimmung der Lysozymaktivität im Zellextrakt

Der Nachweis für das im Extrakt befindliche Lysozym wird nach der Methode von Pryme und Berentson (1970) ausgeführt. Die durch Chloroform sensibilisierten E.coli-Zellen lysieren durch Zugabe von Lysozym, was sich photometrisch durch Abnahme der Extinktion verfolgen läßt.

2.8.1. Herstellung sensibilisierter Zellen

Etwa 0,5 g gefrorene E.coli B-Zellen werden in 0,05 m Tris, pH 7,6, aufgenommen und bis zu einer Zelldichte von $E_{450}^{0,2\text{cm}} = 1$ verdünnt. Nach 1 % Chloroformzugabe wird im Schüttelbad 30' bei 37 °C geschüttelt. Anschließend werden die so behandelten Zellen dreimal in 0,05 m Tris, pH 7,6, gewaschen, d.h. sie werden bei 5 000 Upm 10 min abzentrifugiert und anschließend in Puffer aufgenommen. Die Zellen müssen noch am Tag der Präparation verwendet werden.

2.8.2. Lysozymtest

Die sensibilisierten Zellen werden in 0,05 m Tris, pH 7,6, bis zu einer Extinktion von $E_{450}^{1\text{cm}} = 0,6$ verdünnt und anschließend bei 37 °C vorinkubiert. Jeweils 0,9 ml werden in eine thermostatisierte Küvette (d = 1 cm, 37 °C) pipettiert. Die Reaktion wird mit 0,1 ml Zellextrakt gestartet. In halbminütigem Abstand wird die Extinktion gemessen. Die Anfangsgeschwindigkeit der Extinktionsabnahme ist ein Maß für das im Extrakt befindliche Lysozym.

2.9. Bestimmung der RNS-Polymeraseaktivität im Zellextrakt

Zum Nachweis für die im Extrakt vorhandene RNS-Polymerase wird die Methode von Chamberlin, McGrath und Waskett (1970) verwendet. Im Inkubationsgemisch (IM) befindet sich pro Röhrchen (0,1 ml Endvolumen): 4 μ Mol Tris pH 7,9; 2 μ Mol $MgCl_2$; 3 μ Mol Mercapto-Ethanol; 100 μ g Rinderserumalbumin; je 40 nMol GTP, CTP und UTP; 30 nMol ^{14}C ATP; 10 μ g T7-DNS. In jedes Röhrchen werden 25 μ l der verschiedenen Extrakte gegeben und 20' bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um eine größere Genauigkeit zu erzielen, werden jeweils 4 parallele Ansätze gemessen. Die Reaktion wird mit 0,1 ml gesättigtem $Na_2P_4O_7$ abgestoppt, die Nukleinsäuren werden nach Zugabe von 0,1 ml Heringspermien-DNS als Träger mit 0,5 ml Perchlorsäure ausgefällt. Nach Zugabe von 3 ml H_2O werden die Präzipitate durch ein Zellulosemembranfilter mit einer Porengröße von 0,45 μ (Sartorius, Göttingen) filtriert. Nachdem kräftig mit 10 ml 0,1 M HCl nachgewaschen worden ist, werden die Filter in Polyäthylenzählröhrchen (W. Zinsser, Frankfurt) gegeben und eine halbe Stunde bei 90 °C getrocknet. Mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit gefüllt werden die Fläschchen in einem Scintillationszähler (Marc I Nuclear Chicago) gemessen. Die Menge des ^{14}C ATP-Einbaus ist ein Maß für die im Extrakt enthaltene RNS-Polymeraseaktivität.

2.10. Bestrahlung

Die Phagen werden auf eine Konzentration von ungefähr $5 \cdot 10^{11}$ Phagen/ml in NB bzw. in Histidin-Lösungen verdünnt und in einem Eisbad in die Mitte einer ^{60}Co - γ -Quelle (Atomic Energy of Canada Ltd., Gammacell 200) gestellt, so daß die Proben immer der gleichen Dosisleistung ausgesetzt sind. Am Ort der Proben betrug die Dosisleistung 0,69 Mr/h.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Beschallungsdauer der Bakterienzellextrakte

Durch Ultraschall werden die Bakterienzellwände zertrümmert, die Enzyme treten aus. Um die notwendige Beschallungsdauer für die Herstellung der Zellextrakte zu ermitteln, wurde eine Kinetik des Proteingehaltes im Überstand aufgestellt. Abb. 2 zeigt die Extinktionen gemessen bei 280 m μ nach verschieden langer Beschallungsdauer, gleichzeitig den Titer der jeweils noch vorhandenen Bakterienzellen. Nach 2 min überlebten noch 10 % der Bakterien. Der Proteingehalt im Überstand erreichte bei 2,5 min Beschallungsdauer ein Plateau. So wurde eine Beschallungsdauer von 3 Minuten als ausreichend befunden.

3.2. Bedingungen für die Bestimmung der Enzymaktivitäten

Um quantitative Aussagen über die Änderung der Enzymaktivitäten in den Bakterienzellextrakten nach Phageninfektion machen zu können, wurden zunächst geeignete Bedingungen gesucht. Da wir in unseren Versuchen von den Reaktionsgeschwindigkeiten auf die jeweilige relative Enzymmenge schließen, ist es wichtig, daß wir in einem Bereich arbeiten, in dem die Enzymmenge der Reaktionsgeschwindigkeit linear proportional ist. Dies ist der Fall, wenn das gesamte Enzym im Enzym-Substrat-Komplex vorliegt, also eine Sättigung an Substrat besteht. Es wurde im folgenden geprüft, inwieweit verschiedene Mengen an Zellextrakt auch eine lineare Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bedingen.

3.2.1. Lysozymaktivität

Zu 1 ml sensibilisierte Zellen wurden Mengen von 20 μ l bis 200 μ l des 7,5 min nach der T7-Infektion hergestellten Zellextraktes gegeben und die Abnahme der Extinktion bestimmt (Abb. 3a). In Abb. 3b sind die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Extraktmengen aufgetragen. In folgendem wird mit 100 μ l Extrakt, die größtmögliche Menge innerhalb des linearen Bereiches, gearbeitet.

3.2.2. RNS-Polymeraseaktivität

Abb. 4 zeigt die ATP-Einbaurrate bei Zugabe von 10 μ l und 20 μ l Zellextrakt, gewonnen 4,5 min nach der T7-Infektion. Aus der Beziehung zwischen der Radioaktivität und der ^{14}C ATP-Konzentration in der Inkubationsmischung einerseits und der Radioaktivität in den einzelnen Proben andererseits läßt sich die ATP-Einbaurrate bestimmen. Als Nullwert wurden dabei Kontrollansätze ohne DNS verwendet, da diese eine höhere Radioaktivität zeigten als der Nullwert bei Proben ohne Zellextrakt. Vermutlich liegt im Extrakt in geringen Maße DNS vor, die als Matriz e verwendbar ist. Die getesteten Extraktmengen liegen im linearen Bereich.

3.3. Zeitkinetik der Induktion von Enzymaktivitäten nach Phageninfektion

Um das Maximum der Enzy mbildung nach Infektion mit T7 zu ermitteln, wurde jeweils eine Kinetik mit Extrakten von verschieden lang infizierten Bakterienzellen aufgestellt.

3.3.1. Zeitkinetik des Lysozyms

Die Infektionsdauer bei der T7-Phageninfektion betrug 2, 4, 6 und 8 Minuten. Abb. 5a zeigt die Extinktionsabnahmen bei Zugabe von 0,1 ml der verschiedenen Extrakte zu 0,9 ml sensibilisierte Zellen, Abb. 5b die Anfangsgeschwindigkeiten bei den verschiedenen Infektionszeiten. Eine deutlich meßbare Lysozymaktivität trat demnach erst nach 6 min Infektionsdauer auf.

Für die T1-Phagen wurden Infektionszeiten von 5, 10 und 15 Minuten gewählt. Es konnte jedoch nirgends Enzymaktivität nachgewiesen werden. Deshalb führten wir unsere Versuche mit T7-Phagen durch.

3.3.2. Zeitkinetik der RNS-Polymerase

Es wurde in diesem Falle eine Infektionsdauer von 3, 5, 6, 7, 9 und 10 Minuten gewählt. Abb. 6 zeigt den Einbau von AMP bei Zugabe von 25 μ l der aus verschieden lang infizierten Bakterien hergestellten Extrakte. Das Maximum der Aktivität lag bei 6 min, anschließend nahm die Enzymaktivität wieder ab. Aus diesem Grund wurde für das Experiment mit bestrahlten Phagen eine Infektionsdauer von 6 min gewählt.

3.4. Bestrahlungsbedingungen für die T7-Phagen

Um die Strahlenwirkung auf den direkten Effekt zu beschränken, wurde in Vorversuchen für die T7-Phagen ein geeignetes Bestrahlungsmedium gesucht. Die Strahlenwirkung läßt sich durch die Dosiseffektkurve beschreiben, indem man die relative Plaquebildungsfähigkeit, bezogen auf die der unbestrahlten Phagen, gegen die Strahlendosis aufträgt. Aus der Neigung dieser Kurven läßt sich die Inaktivierungsdosis, die D_{37} , ermitteln. Sie gibt an, bei welcher Strahlendosis die Überlebensrate auf den Wert e^{-1} abgenommen hat, d.h. bei welcher Dosis im Mittel je ein Ereignis pro Phage stattgefunden hat. Der Kehrwert der D_{37} ist ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Funktion.

Abb. 7 zeigt die Überlebenskurven der Phagen, bestrahlt in 0,1 m und 0,3 m Histidin, ferner in NB verschiedener Konzentration. Da die Strahlenempfindlichkeit in 0,3 m Histidin noch zu groß war ($D_{37} = 75$ krad) und deshalb eine Beteiligung des indirekten Effektes nicht auszuschließen war, eine höhere Histidinmenge jedoch nicht mehr löslich war, wurde in NB bestrahlt. In 0,8 %iger NB und in 2,4 %iger NB bestrahlte Phagen wiesen die gleiche D_{37} auf wie die in 0,1 m und 0,3 m Histidin bestrahlten. Abb. 8 zeigt, daß mit zunehmender NB-Konzentration die D_{37} zunimmt, wobei bei 4 %iger NB ($D_{37} = 94$) ein Plateau erreicht ist. Um indirekte Effekte möglichst auszuschalten, muß also in 4 %iger NB bestrahlt werden.

3.5. Inaktivierungskurve der Enzyminduktion

Die in 4 %iger NB auf einen Titer von $5 \cdot 10^{11}$ /ml verdünnten Phagen wurden kumulativ nach der in Abschnitt 2.10. beschriebenen Methode bestrahlt, d.h. nach den Dosen 0, 200, 300, 400 und 600 Krad wurden jeweils 0,1 ml in 2 ml NB pipettiert. Mit diesen Infektionslösungen wurden die auf fünf Röhrchen verteilten E.coli-Zellen (10 ml, Titer $5 \cdot 10^{10}$) beimpft, so daß die m.o.i. bei der unbestrahlten Probe 10 beträgt. Der Lysozymgehalt wurde nach einer Infektionsdauer von 7,5 min, der RNS-Polymerasegehalt nach einer Infektionsdauer von 6 min bestimmt. Abb. 9 zeigt die Extinktionsänderung von sensibilisierten Zellen nach Zugabe von verschiedenen Bakterienextrakten. In Abb. 10 sind die relativen Enzymaktivitäten gegen die Dosis aufgetragen. Die aus diesen Inaktivierungskurven ermit-

telte D_{37} beträgt für Lysozym 170 Krad, für RNS-Polymerase 550 Krad. Im Vergleich wurde jeweils die Überlebenskurve der Plaquebildungsfähigkeit bestimmt; ihre D_{37} beträgt in Übereinstimmung mit den früheren Versuchen (Abb. 7) 94 Krad.

4. Diskussion

4.1. Vergleich der einzelnen Strahlenreaktionen im Bakteriophagen

Um die Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Entwicklungsschritte zu beurteilen, wird die Strahlenempfindlichkeit der getesteten Funktion auf die Strahlenempfindlichkeit der Plaquebildungsfähigkeit bezogen. Dieser Prozentsatz gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, bei wieviel von 100 durch einen letalen Treffer inaktivierten Phagen die getestete Phagenfunktion ebenfalls inaktiviert wird. Ihre Differenz zu 100 drückt aus, welcher Anteil der inaktivierten Phagen den untersuchten Entwicklungsschritt noch vollziehen kann. Um die Inaktivierung der Induktion der RNS-Polymerase- und Lysozymgene einordnen zu können, ziehen wir zum Vergleich die Erzeugung von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen in den bestrahlten Phagen heran sowie die Inaktivierung der Injektionsfähigkeit der Phagen. Diese Strahlenschäden wurden am gleichen T7-Phagenstamm in unserem Institut von Th. Coquerelle und G. Wintermantel untersucht. Zur Beurteilung des Einflusses der Strangbrüche berechneten wir den Anteil der Phagen, die nach einer bestimmten Dosis noch keinen Einzelstrang- bzw. Doppelstrangbruch enthalten, nach

$$N/N_0 = \exp. (- B_{1,2} \cdot P_n),$$

wobei $B_{1,2}$ die Einzelbruch- bzw. Doppelbruchrate pro Nukleotid und P_n die Zahl der Nukleotide pro Phagen genom ist. Dieser Anteil der Phagen ohne Strangbrüche ist in Abbildung 11 zum Vergleich mit der Inaktivierung der Induktion von RNS-Polymerase und Lysozym aufgetragen. Zur Bestimmung der Injektionsfähigkeit bestrahlter Phagen wurden ^{14}C Thymidin-markierte Phagen verwendet. Die Menge der injizierten Phagen genome wird dann durch Aktivitätsbestimmung ermittelt, nachdem die an die Wirtszelle adsorbierte, aber nicht mehr injizierte DNS abgewaschen worden ist. Mit zunehmender Strahlendosis werden weniger Phagen genome in der Zelle gefunden. Ein-

zelheiten dieser Untersuchungen über die Bruchrate in der Phagen-DNS und der Injektionsrate wurden für den Phagen T1 von Bohne u.a. (1970) sowie von Coquerelle und Hagen (1971) dargestellt. Aus Abb. 11 ergibt sich, daß die Doppelstrangbrüche zu 20 % zur Inaktivierung der Phagen beitragen und daß etwa 4 Einzelstrangbrüche pro Inaktivierung der Plaquebildungsfähigkeit auftreten. Weiterhin trägt der Verlust der Injektionsfähigkeit der bestrahlten Phagen zu 33 % an der Inaktivierung der Phagen bei.

4.2. Modelle der Hemmung der Injektion des Phagengenoms

Zur Erklärung der Hemmung der Injektion durch Doppelstrangbrüche werden, wie bereits in der Einleitung beschrieben, zwei Modelle diskutiert: 1) das "Alles-oder-Nichts-Modell" und 2) das "Modell der teilweisen Injektion".

Aus den Untersuchungen von Coquerelle und Wintermantel ergibt sich, daß die Menge der injizierten DNS geringer ist als die Fraktion der Phagen ohne Doppelstrangbruch in der DNS (vgl. Abb. 11). Gilt das Modell 1, so müßten die beiden Dosiseffektkurven eine gleiche Neigung haben. Da die Injektionsfähigkeit sogar noch strahlenempfindlicher ist als die Rate der Doppelstrangbrüche, könnte man zusätzlich sogar einen weiteren Mechanismus annehmen, der neben den Doppelstrangbrüchen zur Hemmung der Injektionsfähigkeit führt. Bei dem Modell 2, der partiellen Injektion, müßte dagegen die Injektionsfähigkeit der Phagen wesentlich strahlenresistenter sein als die Rate der Doppelstrangbrüche, weil in diesem Fall nicht nur die intakten DNS-Stränge ohne Doppelstrangbrüche injiziert werden, sondern auch die Bruchstücke der DNS vom Beginn bis zum Doppelstrangbruch. Eine genaue Ableitung einer solchen hypothetischen Dosiseffektkurve findet sich bei Coquerelle und Hagen (1972). Dieses Modell ist aber auf jeden Fall für unsere Beobachtungen am bestrahlten T7-Phagen nicht anwendbar. Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen am T1-Phagen (Coquerelle und Hagen, 1972), wo ebenfalls die Strahlenempfindlichkeit der Injektionsfähigkeit einer größer war als die Rate der Doppelstrangbrüche und nicht kleiner, wie aus dem Modell der partiellen Injektion zu fordern wäre.

In vorliegender Arbeit gingen wir nun von folgender Überlegung aus: Gilt das Modell der teilweisen Injektion (2), so wird die DNS bis zur ersten Doppelbruchstelle oder einem anderen Hindernis injiziert. Funktionen dieses ersten Stückes müssen nachweisbar sein. Dazu gehören mit großer Wahrscheinlichkeit die "frühen Enzyme", die durch die wirtsspezifische RNS-Polymerase transkribiert werden.

Da der Wirt und seine Polymerase ja nicht bestrahlt wurde, hängt die Bildung der "frühen Enzyme" ausschließlich von der Intaktheit sowie von der Anwesenheit des ersten Abschnittes des Phagengenoms ab. Die Bildung der frühen Enzyme muß also im Modell (2) strahlenresistenter sein als die Rate der Doppelstrangbrüche in der DNS. Gilt jedoch das "Alles-oder-Nichts-Modell" (1), muß die Strahlenempfindlichkeit der Enzymbildung und die der Rate der Doppelstrangbrüche gleich groß sein.

Die Strahlenempfindlichkeit der Bildung von phagenspezifischer RNS-Polymerase beträgt 17 %, sie ist geringer als die Strahlenempfindlichkeit der DNS-Doppelstränge, die 20 % beträgt. Zusätzlich muß man berücksichtigen, daß vermutlich etwa 5 % der Phagen durch Hemmung der Adsorption an die Bakterienwand inaktiviert werden, also für die Induktion der Polymerase nicht in Betracht kommen und daß auch der DNS-Abschnitt selbst, der die phagenspezifische RNS-Polymerase codiert, durch Basenschäden inaktiviert werden kann.

Es gibt also einen nicht unbeträchtlichen Anteil von Phagen, deren DNS Doppelbrüche aufweist und die trotzdem das RNS-Polymerasegen zu injizieren vermögen. Danach erscheint das "Alles-oder-Nichts-Modell" ebenso nicht mit den experimentellen Ergebnissen vereinbar. So kann keines der beiden Modelle die tatsächlichen Verhältnisse beschreiben.

4.3. Mögliche Fehler der Versuchsergebnisse

Vergleichen wir die Injektionsrate (33 %) mit der RNS-Polymerasebildungsfähigkeit, so ergibt sich ein gewisser Widerspruch: Von 100 inaktivierten Phagen vermögen nur 67 % DNS zu injizieren, während 83 % der Phagen in der Lage sind, RNS-Polymerase zu bilden. Gibt es Fehler in den Versuchsergebnissen, die dies erklären könnten?

Zunächst einmal muß erwogen werden, ob die größere Strahlenresistenz der RNS-Polymerase darauf beruhen kann, daß wir neben der phagenspezifischen RNS-Polymerase immer die unbestrahlte wirtsspezifische RNS-Polymerase mitgemessen haben. Beim Aufstellen der Zeitkinetik der RNS-Polymerase konnte aber gezeigt werden, daß in der Zeit bis zu 3 Minuten, also bevor phagenspezifische RNS-Polymerase gebildet ist, bei unserer Methode keine deutlich meßbare RNS-Polymerase gefunden wurde (siehe Abb. 6). Dies konnte auch durch Kontrollen ohne Phageninfektion bestätigt werden.

Weiter ist zu überlegen, ob die gewählte hohe Multiplizität von 10 zu Fehlern führen kann. Unter Umständen kann in diesem Fall der limitierende Faktor bei der Transkription nicht die Zahl der injizierten Phagen-DNS, sondern die Zahl der Replikationszentren in der Wirtszelle sein, so daß trotz geringerer DNS-Injektion nach Bestrahlung die Enzymbildungsfähigkeit nicht im gleichen Maße abnimmt. Damit ließe sich die relativ hohe Strahlenresistenz der RNS-Polymerasebildung durchaus erklären. Allerdings dürften demnach die Punkte der Inaktivierungskurve nicht auf einer Geraden, sondern auf einer nach unten gekrümmten Kurve liegen entsprechend einer Mehrtrefferkurve. Diese möglichen Fehler in den Versuchsbedingungen erweisen sich demnach als nicht sehr wahrscheinlich.

4.4. "Modell der Injektionsnennung nach der Region der frühen Enzyme"

Da die beiden diskutierten Modelle die Ergebnisse nicht befriedigend erklären können und der Widerspruch zwischen der Strahlenempfindlichkeit der DNS-Injektion und der Injektion des RNS-Polymerase-Gens bestehen bleibt, überlegten wir, ob nicht ein Modell denkbar ist, das die Ergebnisse besser zu erklären vermag. Beim Phagen T5 ist bekannt, daß die Injektion der DNS in zwei Schritten erfolgt. Zunächst wird ein bestimmtes Stück - ungefähr 8 % des gesamten DNS-Moleküls - in die Wirtszelle injiziert. Die durch dieses DNS-Stück erfolgte Proteinsynthese soll für die Transkription des restlichen DNS-Moleküls verantwortlich sein. (Bujard, 1969; Mc Corquodale, Lanni, 1964). Dies könnte der Region der "frühen Enzyme" beim Phagen T7 entsprechen, für die Hausmann 7 % des gesamten DNS-Moleküls angibt. Am Phagen T7 wurde diese

Vorstellung der "Zwei-Schritte-Injektion" nicht beschrieben. Jedoch kann möglicherweise durch Strahlenschäden eine solche stoßweise Injektion ausgelöst werden. Dabei vermag ein größerer Teil der Phagen das erste DNS-Stück zu injizieren, während er nicht mehr in der Lage ist, den zweiten Stoß durchzuführen. Nach diesem Modell 3, dem "Modell der Injektionshemmung nach der Region der frühen Enzyme" befindet sich eine vernhältnismäßig große Anzahl kurzer DNS-Stücke in der Wirtszelle, die das RNS-Polymerase-Gen enthalten und somit in der Lage sind, RNS-Polymerase zu bilden. Bei der quantitativen Bestimmung der injizierten DNS wird jedoch die gesamte Radioaktivitätsmenge im Bakterium gemessen, so daß der Anteil der kurzen DNS-Stücke des ersten Stoßes, deren Radioaktivitäten im Vergleich zu ganzen DNS-Molekülen sehr gering ist, kaum ins Gewicht fällt. Hieraus wird es verständlich, daß die RNS-Polymerasebildung deutlich strahlenresistenter ist als die DNS-Injektion. Weiter ist es denkbar, daß zur Injektion des zweiten DNS-Abschnittes nur der Phagenanteil in der Lage ist, deren Doppelstränge intakt sind. Für diese DNS-Region hat dann Modell 1 Gültigkeit. Die Expression des RNS-Polymerasegens hingegen kann neben der Adsorptionshemmung lediglich durch Doppelbrüche und Basenschäden in der frühen Region des DNS-Moleküls selbst gehemmt werden.

4.5. Strahlenempfindlichkeit der Lysozyminduktion

Die Strahlenempfindlichkeit der Lysozymbildungsfähigkeit beträgt 55 %. Von 100 inaktivierten Phagen sind also nur mehr 45 % in der Lage, Lysozym zu bilden, während 68 % injiziert werden und 83 % RNS-Polymerase bilden können (Abb. 11). Diese sehr viel höhere Strahlenempfindlichkeit der Lysozymbildungsfähigkeit im Vergleich zu der der RNS-Polymerasebildungsfähigkeit läßt darauf schließen, daß das Lysozym kein "frühes Enzym", sondern ein durch die Phagen-RNS-Polymerase transkribiertes Enzym ist. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Hausmann überein, der das Lysozym ebenfalls zu den "späten Enzymen" zählt (Hausmann und Härle, 1971).

Das Gen des Lysozyms liegt also auf der Region der DNS, die erst mit dem zweiten Stoß injiziert wird. Neben der Adsorptionshemmung bestehen folgende Möglichkeiten der Hemmung: Erstens verhindern

Doppelstrangbrüche und Basenschäden in der frühen Region die Bildung der phagenabhängigen RNS-Polymerase, so daß das Lysozymgen nicht transkribiert werden kann. Zweitens wird durch Doppelstrangbrüche die Injektion der DNS verhindert, so daß das Lysozymgen nicht injiziert wird, und drittens dürfen keine anderen Strahlenschäden wie Basenschäden auf dem Lysozymgen selbst vorhanden sein. Die hohe Strahlenempfindlichkeit der Lysozyymbildungsfähigkeit wird dadurch verständlich.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Strahlenempfindlichkeit der RNS-Polymerase- und Lysozyymbildungsfähigkeit beim Vermehrungszyklus des Phagen T7 untersucht. Es wurden Escherichia coli B-Zellen mit ^{60}Co - γ -bestrahlten T7-Phagen infiziert. Der Replikationsprozeß wurde jeweils zu dem Zeitpunkt abgebrochen, zu dem das Maximum der Bildung des untersuchten Enzyms zu erwarten war, für RNS-Polymerase nach 6 min, für Lysozym nach 7,5 min. Aus den Extrakten der durch Ultraschall geöffneten Zellen wurde jeweils durch spezifische Enzymtests die Menge der gebildeten Enzyme bestimmt.

Die Strahlenempfindlichkeit der Enzymbildungsfähigkeit wird mit der in früheren Arbeiten ermittelten Strahlenempfindlichkeit anderer Entwicklungsschritte verglichen. Der Anteil der inaktivierten Phagen, der RNS-Polymerase bilden kann (83 %), ist größer als der Anteil, deren DNS intakte Doppelstränge aufweist (79,5 %) und der Anteil, der DNS zu injizieren vermag (68 %). Es wird angenommen, daß unter Bestrahlungsbedingungen der T7-Phage - ähnlich wie es vom Phagen T5 bekannt ist - die DNS in zwei Schritten injiziert. Dabei wird der frühe Stoß, durch den das RNS-Polymerasegen injiziert wird, von Doppelstrangbrüchen der späteren Region nicht beeinflusst, so daß die RNS-Polymerasebildung nur wenig beeinträchtigt wird. Den zweiten Stoß der DNS-Injektion können nur Phagen vollführen, deren DNS keine Doppelstrangbrüche aufweist. Der sehr niedrige Anteil der inaktivierten Phagen, der noch Lysozym zu bilden vermag (45 %), macht wahrscheinlich, daß Lysozym kein frühes, durch Wirts-RNS-Polymerase transkribiertes Enzym ist.

6. Literaturverzeichnis

Adams, M.H. (1959)

Bacteriophages.

Interscience Publish. Inc., New York

Bohne, L., Coquerelle, T., and Hagen, U. (1970)

Radiation sensitivity of bacteriophage DNA

II. Breaks and cross-links after irradiation in vivo.

Int. J. Radiat. Biol. 17, 205

Bujard, H. (1969)

Location of single-strand interruptions in the DNA of bacteriophage T5.

Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 1167

Chamberlin, M., McGrath, J., and Waskell, L. (1970)

New RNA-polymerase from Escherichia coli infected with bacteriophage T7.

Nature 228, 227

Coquerelle, T., and Hagen, U. (1971)

Loss of adsorption and injection abilities in γ -irradiated phage T1.

Int. J. Radiat. Biol. 21, 31

Mc Corquodale, D.J., and Lanni, Y.T. (1964)

Molecular aspects of DNA transfer from phage T5 to host cells

I. Characterization of first-step-transfer material.

J. Mol. Biol. 10, 10

Dertinger, H. und Jung, H. (1969)

Molekulare Strahlenbiologie.

Heidelberger Taschenbücher, Springer-Verlag, Heidelberg

Freifelder, D. (1965)

Mechanism of inactivation of coliphage T7 by X-ray.

Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 128

Freifelder, D. (1968)

Physicochemical studies on X-ray inactivation of bacteriophage.
Virology 36, 613

Ginoza, W. (1967)

The effects of ionizing radiation on nucleic acids of bacteriophages and bacterial cells.

Rev. Microbiol. 21, 325

Harm, W. (1958)

Multiplicity reactivation, marker rescue and genetic recombination in phage T4 following X-ray-inactivation.

Virology 5, 337.

Hausmann, R., and Härle, E. (1971)

Expression of the genomes of the related bacteriophages T3 and T7.
First European Biophysics Congress, Vol. I, 467

Herrlich, P., and Schweiger, M. (1971)

Regulation of T7 and T3 protein synthesis.

First European Biophysics Congress, Vol. I, 489.

Verlag der Wiener Medizinischen Akademie

Latarjet, R. (1972)

Interaction of radiation energy with nucleic acids.

Current Topics in Radiation Research Quarterly 8, 1

Leighton, S.B., and Rubenstein, I. (1968)

The calibration of molecular weight scales for DNA (abstract).

Biophys. Journ. 8, A-80

Lytle, C.D., and Ginoza, W. (1969)

Intracellular development of bacteriophage ϕ X 174 inactivated by γ -ray, ultraviolet light, or nitrous acid.

Virology 38, 152

Platzman, R.L. (1958)

The physical and chemical basis of mechanisms in radiation biology.

In: Radiation Biology and Medicine, W.D. Claus, ed., Addison-Wesley, Reading, Mass., p. 15

Platzman, R.L. (1962)

Superexcited states of molecules and the primary action of ionizing radiation.

Vortex 23, 372.

Pryme, I.F., and Berontsen, S.A. (1970)

Lysozyme synthesis in Escherichia coli B cells infected with phage T7.

Biochim. Biophys. Acta 204, 630

Schön, M. (1973)

Die Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Entwicklungsschritte im Vermehrungszyklus des Bakteriophagen ϕX 174 nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung.

Dissertation, Universität Karlsruhe

Studier, F.W., and Maizel, J.W. (1969)

T7-directed protein synthesis.

Virology 39, 575.

Sharp, J.D., and Freifelder, D. (1971)

Interruption of DNA injection by X-irradiation of phage λ .

Virology 43, 166

Ullrich, M., and Hagen, U. (1968)

Über die Strahlenempfindlichkeit der Wasserstoffbrücken in der Desoxyribonucleinsäure.

Zeitschr. f. Naturforschg. 23, 1176

Watson, J.D. (1950)

The properties of X-ray-inactivated bacteriophage.

I. Inactivation by direkt effect.

J. Bacteriol. 60, 617

Watson, J.D. (1952)

The Properties of X-ray inactivated bacteriophage.

II. Inactivation by indirect effects.

J. Bacteriol. 63, 473

Weiss, J.J. (1964)

Chemical effects of ionizing radiations on nucleic acids and related compounds.

Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 3
(New York: Academic Press), p. 102

7. Abbildungen

Abb. 1: Die zeitlichen Phasen der Strahlenwirkung
(Platzman, 1958, 1962; Dertinger, Jung, 1969)

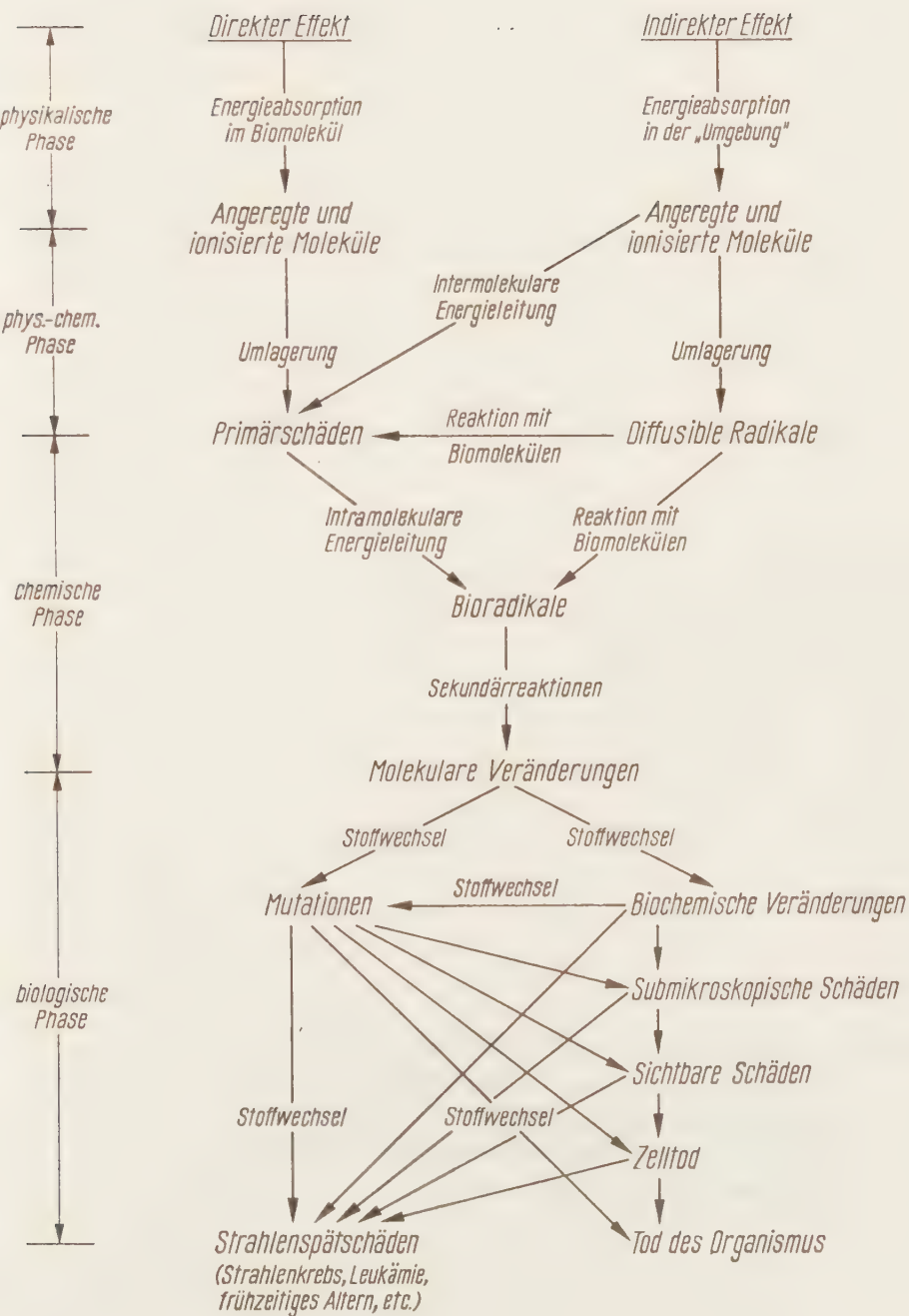


Abb. 2: Proteingehalt (E_{280}^{1cm}) des Überstandes einer E.coli-Suspension in Abhängigkeit der Dauer der Ultraschallbehandlung; im Vergleich dazu die jeweilige Überlebensrate (Koloniebildungstest)

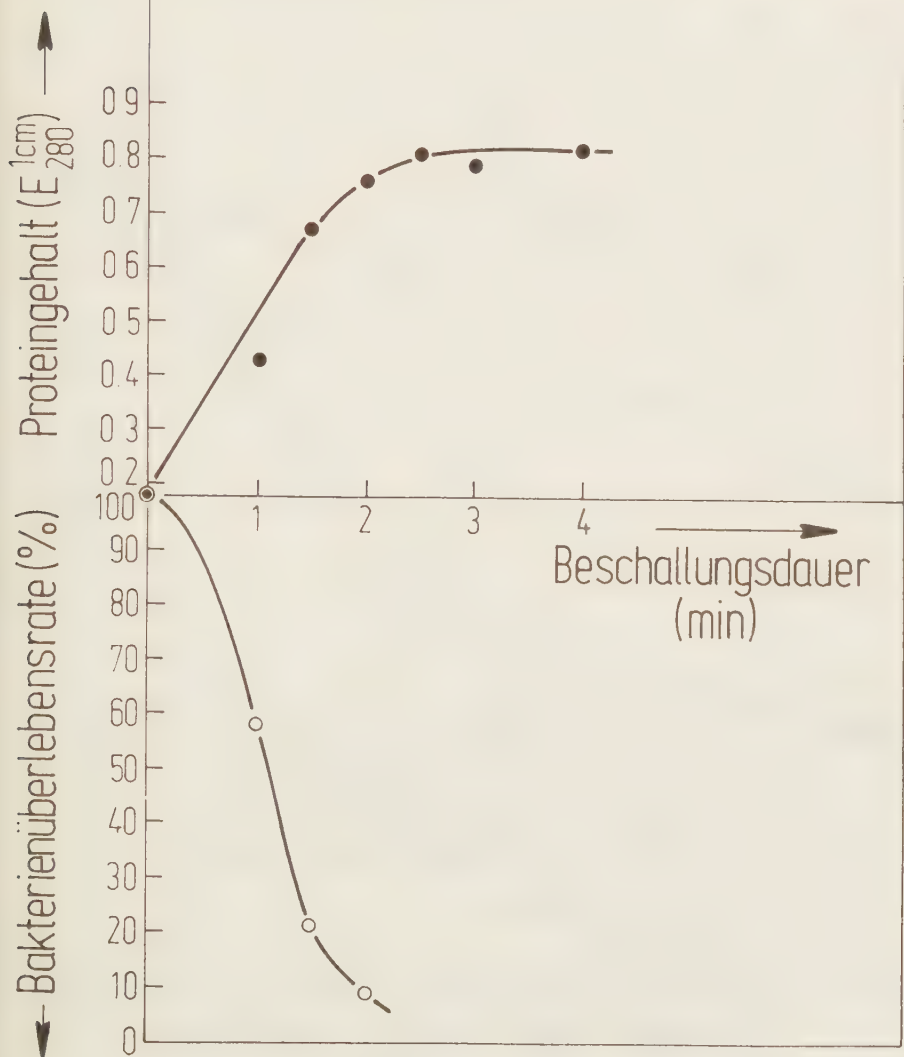


Abb. 3: Bestimmung der Lysozymaktivität im Zellextrakt durch Lysis von sensibilisierten Zellen.

a) Zeitliche Änderung der Extinktion einer Suspension sensibilisierter Zellen (1 ml) nach Zugabe verschiedener Mengen Extrakt

- (●) 20 μ l Extrakt
- (o) 50 μ l "
- (▲) 100 μ l "
- (Δ) 150 μ l "
- (■) 200 μ l "

b) Kinetik der aus Abb. 3a ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der zugegebenen Mengen Extrakt

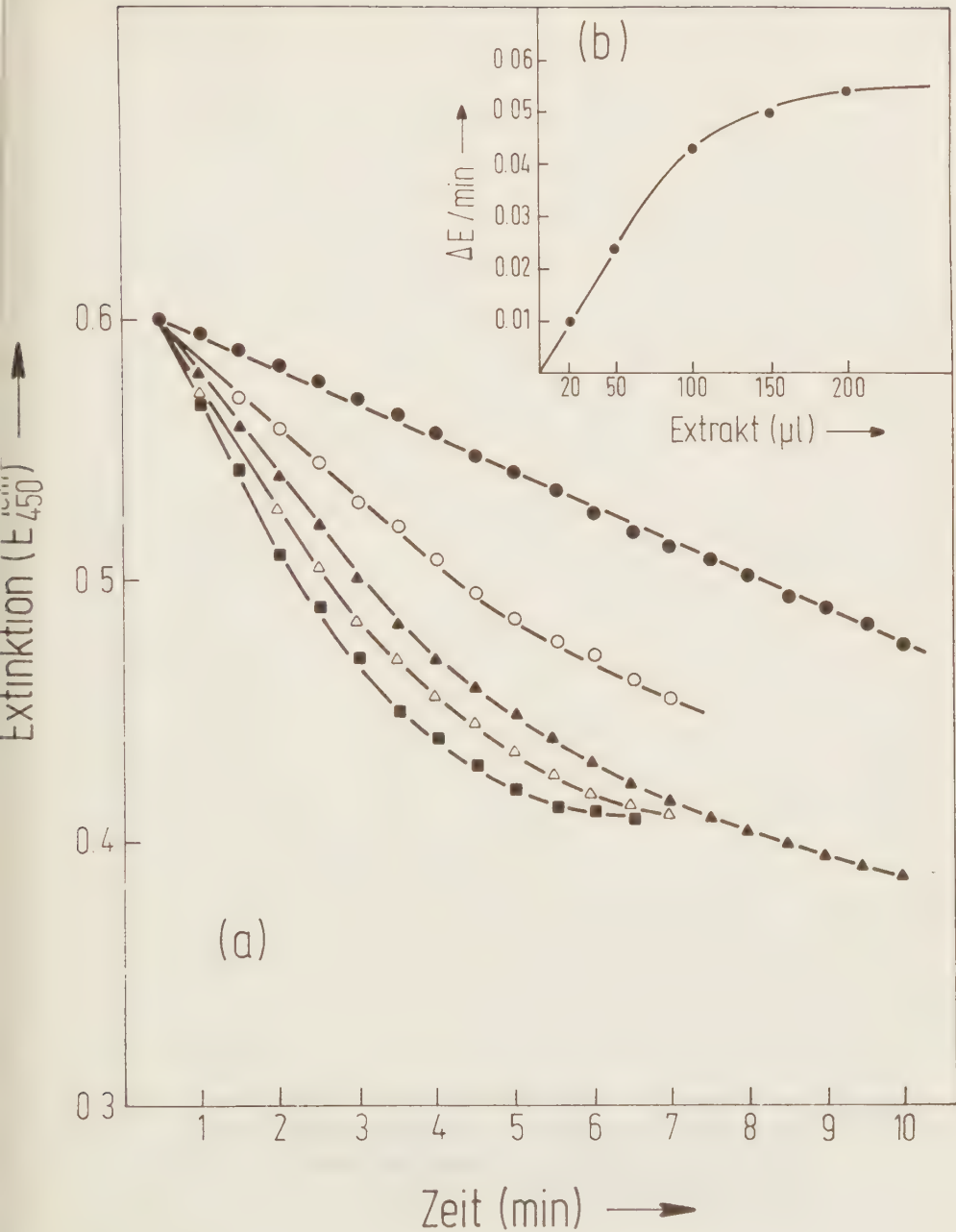


Abb. 4: Bestimmung der Aktivität der RNS-Polymerase:
[^{14}C] ATP-Einbaurrate in Abhängigkeit der zuge-
gebenen Mengen Zell-Extrakt, hergestellt
4,5 min nach der Phageninfektion

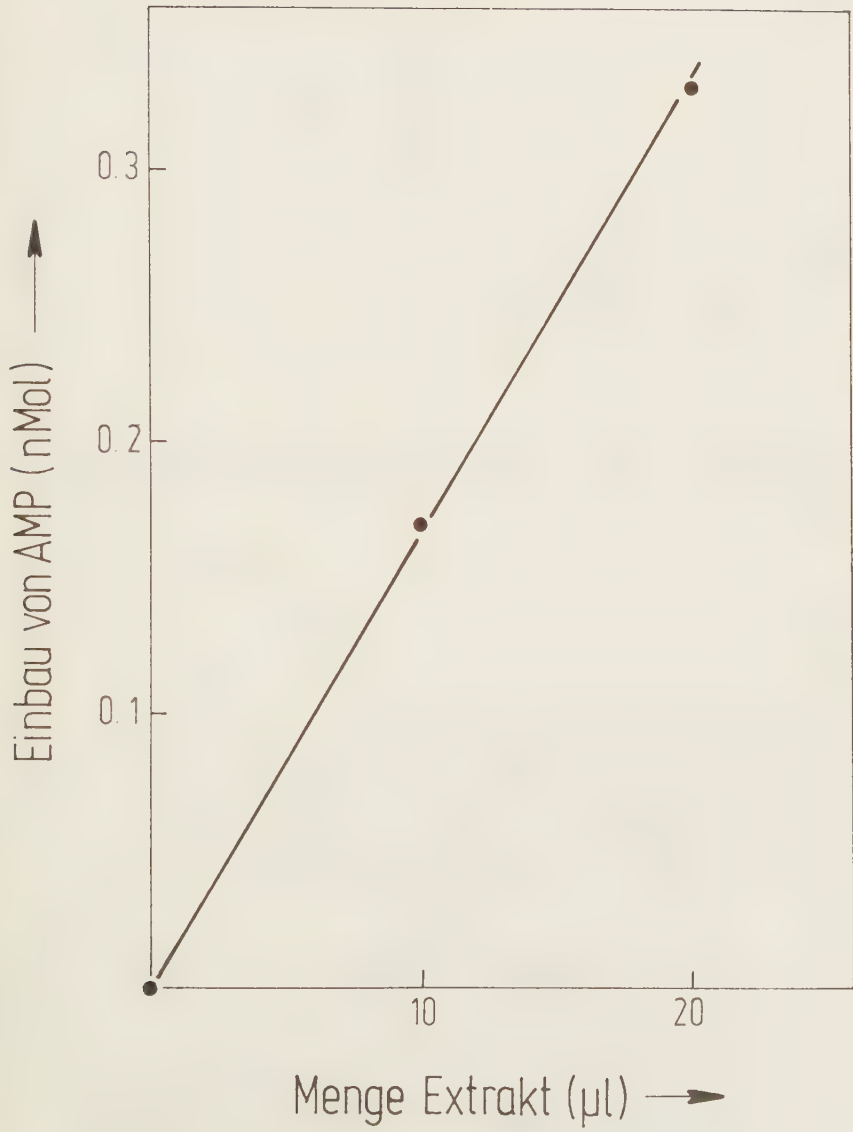


Abb. 5: Induktion der Lysozymaktivität

- a) Zeitliche Änderung der Extinktion bei 450 nm einer Suspension sensibilisierter Zellen nach Zugabe von jeweils 10 μ l Extrakt aus verschieden lang infizierten Bakterienzellen. Extrakt hergestellt:
 - (●) 2 min nach der Infektion
 - (o) 4 min nach der Infektion
 - (▲) 6 min nach der Infektion
 - (△) 8 min nach der Infektion
- b) Kinetik der aus Abb. 5a ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Infektionszeiten

Extinction (E_{450}^{coll}) $\uparrow$

0.6

0.5

0.4

(a)

Zeit (min) $\rightarrow$

$\Delta E / \text{min}$ $\uparrow$

(b)

0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01

Infektionsdauer (min) $\rightarrow$

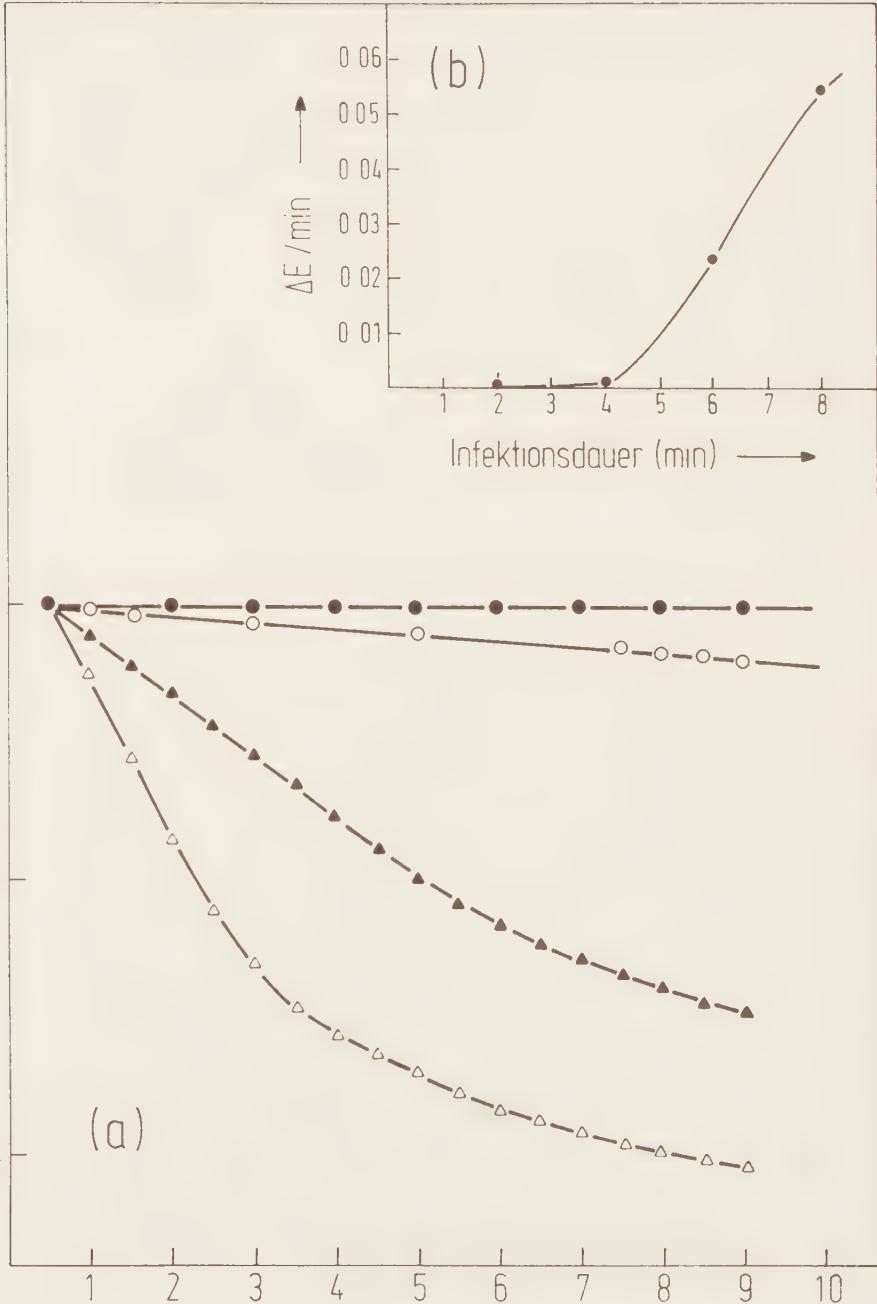


Abb. 6: Induktion der phagenspezifischen RNS-Polymerase
Kinetik der [^{14}C] AMP-Einbaurrate in Abhängigkeit
der Infektionszeiten (Einbau von nMol AMP mit
25 μl Extrakt)

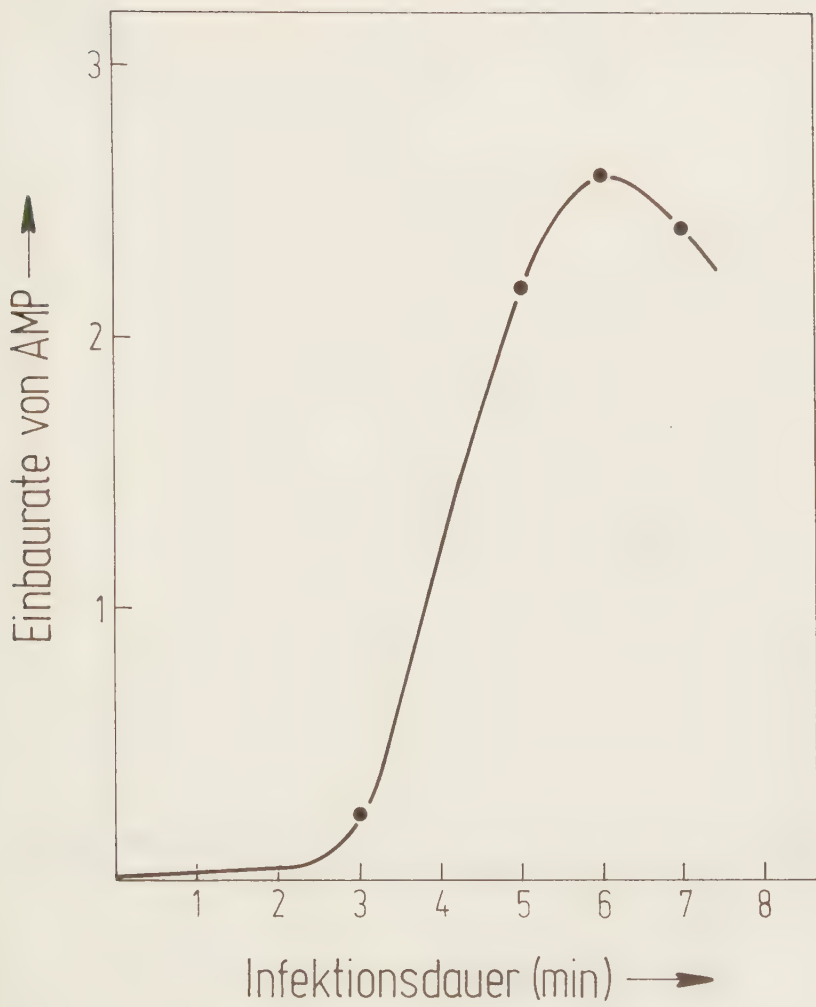


Abb. 7: Inaktivierungskurven der Plauebildungsfähigkeit vom Bakteriophagen T7 in verschiedenen Bestrahlungsmedien

- (□) 0,1 m Histidin
- (■) 0,3 m Histidin
- (▲) 0,8 %ige Nährbouillon
- (△) 2,4 %ige Nährbouillon
- (o) 3,2 %ige Nährbouillon
- (●) 4 %ige Nährbouillon

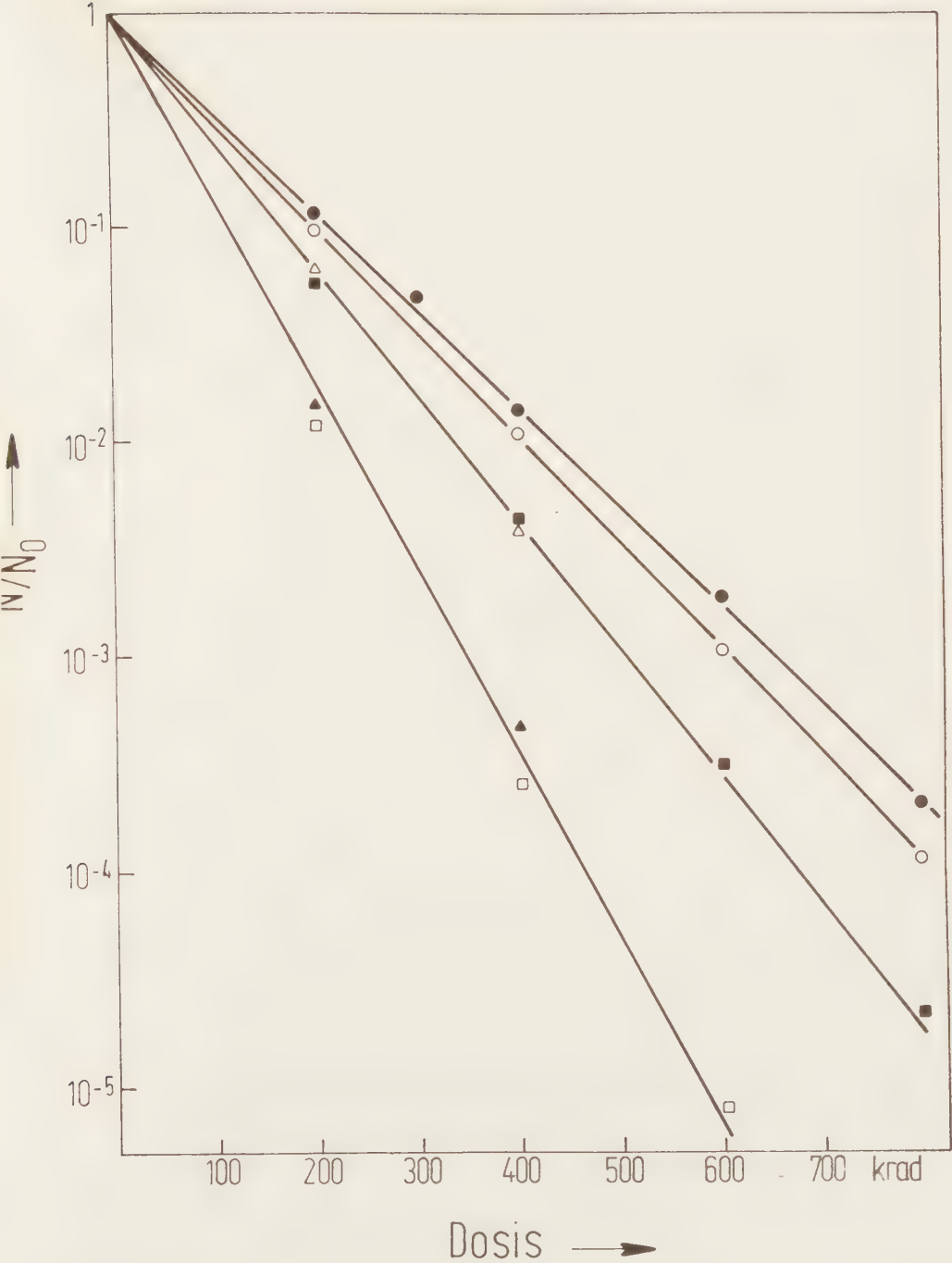


Abb. 8: Die D_{37} der Plauebildungsfähigkeit der Phagen
T7 als Funktion der NB-Konzentration während
der Bestrahlung

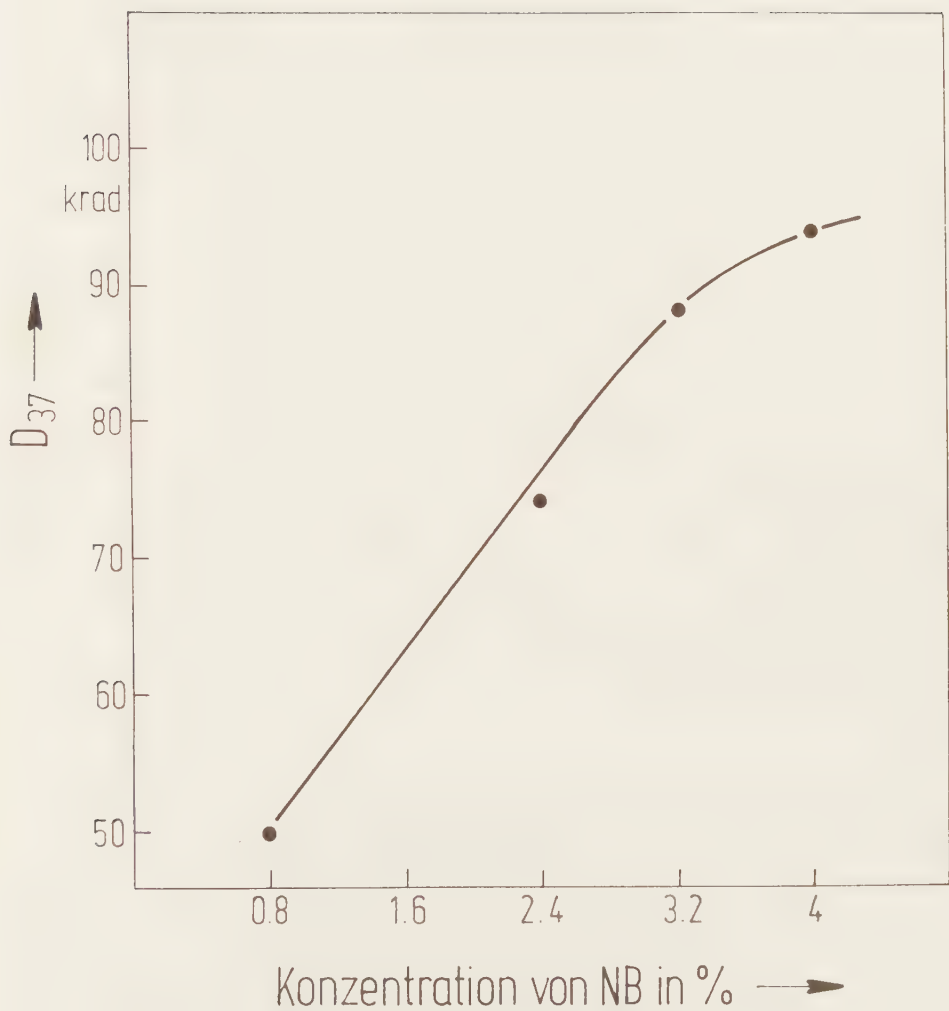


Abb. 9: Inaktivierung der Lysozyminduktion.

Zeitliche Änderung der Extinktion (E_{450}^{1cm})
einer Suspension von sensibilisierten
Bakterien nach Zugabe von 100 μ l Extrakt
aus mit bestrahlten T7-Phagen infizierten
Bakterien (Infektionsdauer 7,5 min).
Extrakt hergestellt aus:

- (■) unbestrahlten T7-Phagen
- (Δ) mit 200 Krad bestrahlten T7-Phagen
- (▲) mit 300 Krad bestrahlten T7-Phagen
- (o) mit 400 Krad bestrahlten T7-Phagen
- (●) mit 600 Krad bestrahlten T7-Phagen

Extinktion ($E_{450}^{1\text{cm}}$) $\uparrow$

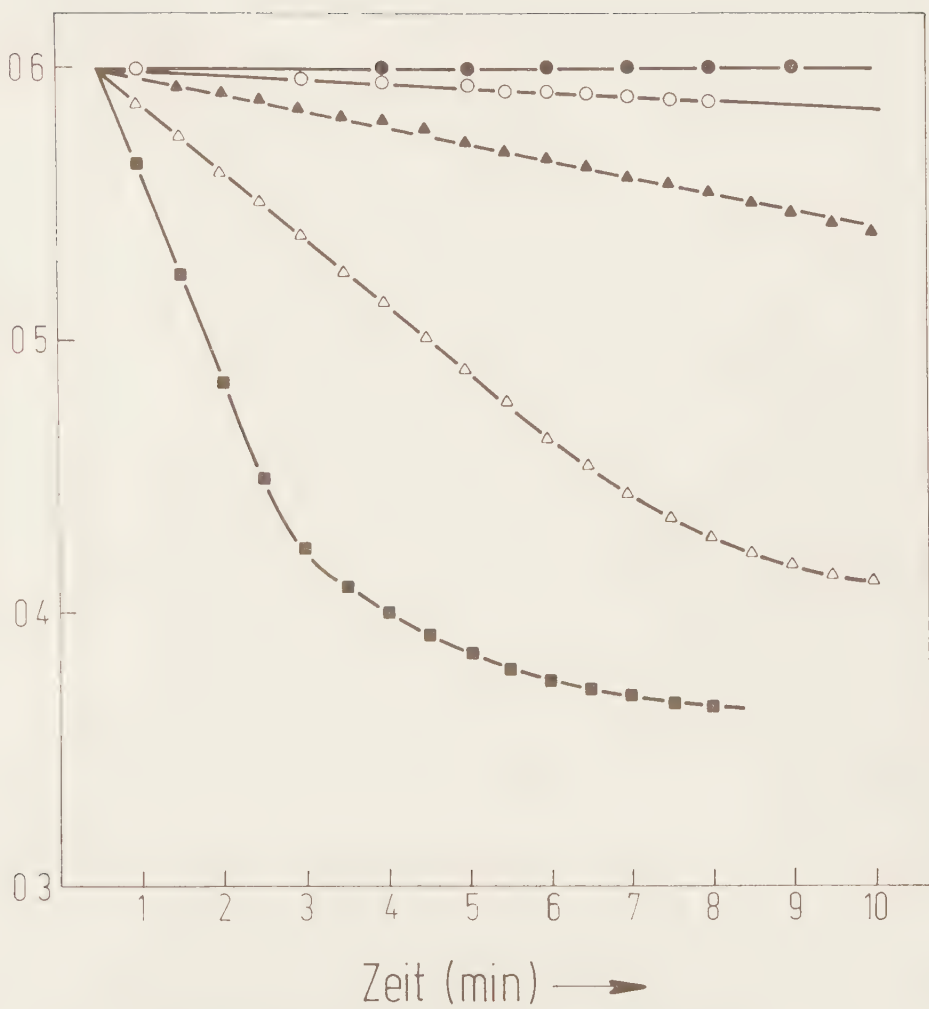


Abb. 10: Inaktivierung der (■) RNS-Polymerasebildungs-
fähigkeit, (▲) Lysozymbildungsfähigkeit und
● Plaquebildungsfähigkeit

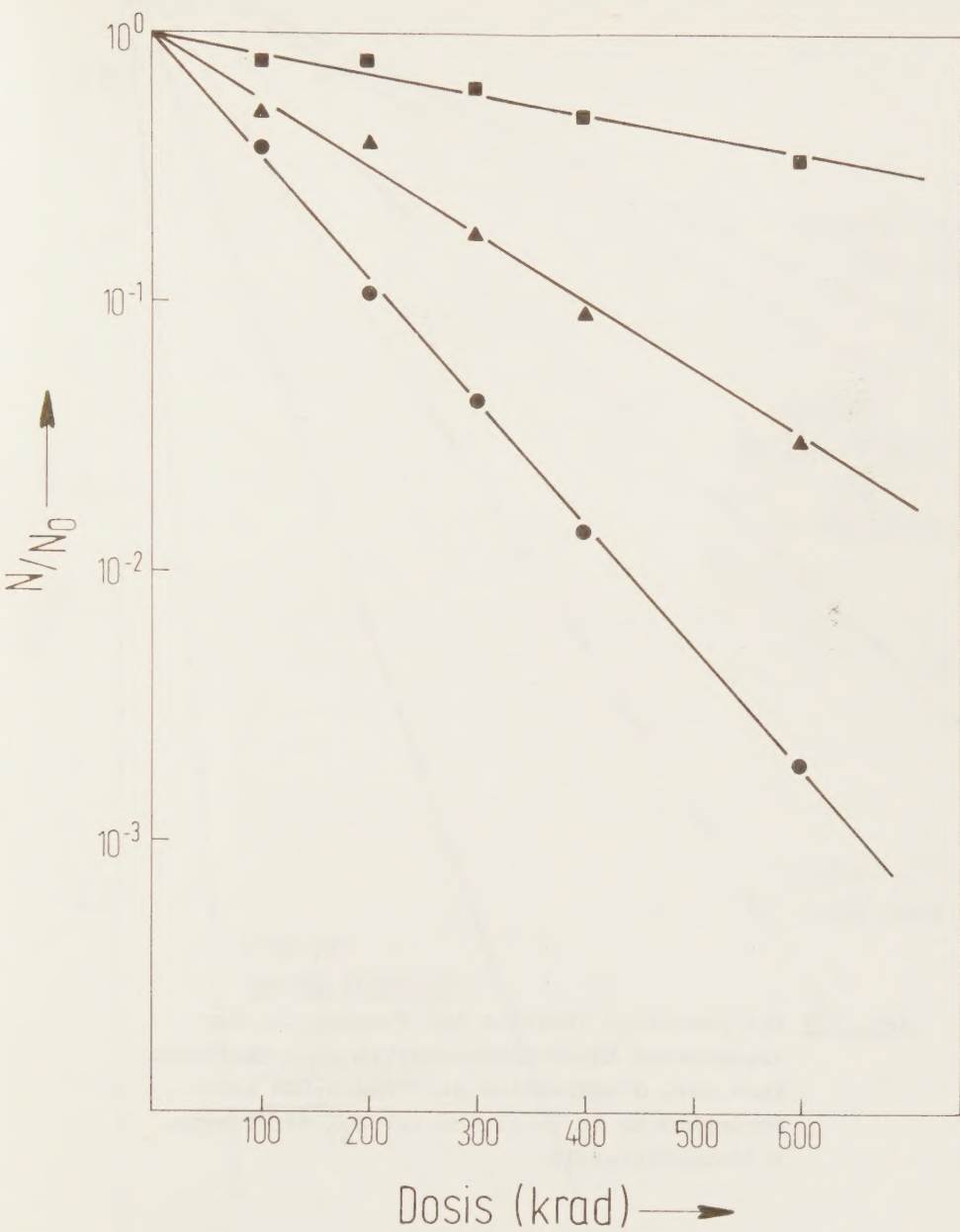




Abb. 11: Die jeweilige Fraktion der Phagen, die den angegebenen Entwicklungsschritt noch ausführen kann, bzw. die Fraktion der Phagen-DNS ohne Strangbrüche im Vergleich zur D_{37} der Plaquebildungsfähigkeit

